

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-005635

(43)Date of publication of application : 12.01.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/543

(21)Application number : 06-163317

(71)Applicant : WAKAMOTO PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 23.06.1994

(72)Inventor : SUZUKI HIROKAZU
OHASHI YOSHITAMI
MOCHIDA RITSUKO
WAKASUGI MASAHIKO
MAEDA MAKOTO

(54) IMMUNOLOGICAL DETECTION METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a method for simultaneously detecting a plurality of immunologically corresponding substances present in a specimen.

CONSTITUTION: More than one kind of immunologically reactive substance is labeled with more than one kind of colored latex particle having different color tone answering the purpose. On the other hand, solid-phase reaction of more than one kind of immunologically reactive substance takes place previously at different positions on a same support. Subsequently, a compound of more than one kind of labeled colored latex particles is caused to react on one or more than one kind of unknown immunological substance in a liquid to be inspected. Finally, the compound of an immunologically formed composite and colored latex particles is developed and moved using the liquid to be inspected as a medium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.06.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 25.03.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2003-06818

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 22.04.2003

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-5635

(43) 公開日 平成8年(1996)1月12日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 1 5 Z			
	5 4 1 Z			

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平6-163317	(71) 出願人	000100492 わかもと製薬株式会社 東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号
(22) 出願日	平成6年(1994)6月23日	(72) 発明者	鈴木 宏和 東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか もと製薬株式会社内
		(72) 発明者	大橋 良民 東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか もと製薬株式会社内
		(72) 発明者	持田 立子 東京都中央区日本橋室町1-5-3 わか もと製薬株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫学的検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】被検体中に存在する複数の免疫学的に対応する物質を同時に検出する方法を提供する。

【構成】検出目的に適う少なくとも2種類以上の色調の異なる着色ラテックス粒子を、あらかじめ少なくとも2種類以上の免疫学的に反応する能力のある物質に各々標識せしめ、一方、同一支持体上の異なる位置に少なくとも2種類以上からなる免疫学的に反応する能力のある物質をあらかじめ固相化し、ついで2種類以上からなる標識着色ラテックス粒子の混合物と被検液中の未知の少なくとも1種類以上の免疫学的物質と反応せしめ、ついで免疫学的に形成させた複合体ー着色ラテックス粒子の混合物を被検液を媒体として展開・移動せしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検出目的に適う少なくとも 2 種類以上の免疫学的に異なる物質を同時に確認できる免疫学的検出方法であって、

a. 少なくとも 2 種類以上の色調の異なる着色ラテックス粒子を、あらかじめ検出目的に適う少なくとも 2 種類以上の免疫学的に反応する能力のある物質に各々標識せしめ、

b. 一方、同一支持体上の異なる位置に少なくとも 2 種類以上からなる免疫学的に反応する能力のある物質を、あらかじめ固相化し、

c. ついで、2 種類以上からなる標識着色ラテックス粒子の混合物と被検液中の未知の少なくとも 1 種類以上の免疫学的物質と反応せしめ、

d. ついで、免疫学的に形成させた複合体—着色ラテックス粒子の混合物を被検液を媒体として、展開・移動せしめ、

e. 検出目的に適う少なくとも 2 種類以上の免疫学的に反応する能力を有する物質をあらかじめ固相化しておいた複数の位置に、それぞれ対応する免疫学的に形成させた複合体—着色ラテックス粒子で着色することを特徴とする免疫学的検出方法。

【請求項 2】 検出しようとする物質が検出目的に適う抗原である請求項 1 の方法。

【請求項 3】 検出しようとする物質が検出目的に適う抗体である請求項 1 の方法。

【請求項 4】 検出しようとする物質がヘモグロビン及びアルブミンである請求項 2 の方法。

【請求項 5】 検出しようとする物質が β_2 —ミクログロブリン、アルブミン及びヒトレチノール結合タンパクである請求項 2 の方法。

【請求項 6】 検出しようとする物質がミオグロビン、ミオシン L 鎖及びクレアチンキナーゼ MB である請求項 2 の方法。

【請求項 7】 検出しようとする物質がヘモグロビン及びトランスフェリンである請求項 2 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は免疫学的に異なる検出目的に適う少なくとも 2 種類以上の物質を同一支持体上で各々別々の位置で検出する手段を提供することによって、広範囲の産業上の利用分野に応用が可能である。医療分野においては、体外診断薬を中心として、例えば特定の疾患に対する複数の関連マーカーを検出することによって、より信頼性の高い診断を、また、複数の疾患に対する複数のマーカーを用いることによって、未知の疾患の診断予測が可能である。

【0002】 食品分野においては、汚染微生物の特定や有害物質の検出にも応用が可能である。一方、環境分野においては、環境汚染源が免疫学的な反応に関与しう

物質もしくは生物体の一部を構成し免疫学的な反応を応用しうる物質であれば、それらの物質を特定することも可能である。

【0003】

【従来の技術】 従来、微粒子を用いたイムノクロマトグラフ法にはコロイド状金属粒子、コロイド状金属酸化物粒子、さらにはコロイド状非金属粒子が標識粒子として広く用いられており、特開昭 64-32169 に記載されているごとくすでに公知である。

【0004】 また、近年、合成高分子化学分野の発展と共に染色された合成高分子ラテックス粒子の技術開発にはめざましいものがあり、この微粒子を用いるイムノクロマトグラフ法も開発され、特開平 5-10950 に記載されているごとくすでに公知の方法である。

【0005】 本法を利用した製品には妊娠診断薬（クリアブルーワンステップ（登録商標）ユニパス社製、プレディクター（登録商標）アルロンシェファロ社製）によって代表される。しかしながら、イムノクロマトグラフ法を利用した検出方法においては、上述の妊娠診断薬で見られるように 1 種類の抗原または抗体の検出方法でもって、所期目的を達成するものであり、本発明の最も重要な特許構成要件である「検出目的に適う複数の免疫学的に異なる物質を検出するにあたり、イムノクロマトグラフ法によりクロマトグラフ支持体上において、同時に、別々な位置で、さらには各々単一の色調で検出する」という方法は未だ開示された例がない。

【0006】 ここに云う検出目的に適う少なくとも 2 種類以上の物質とは、例えば実施例 2 に示すごとく、腎疾患に対しては、尿中の微量アルブミン、 β_2 —ミクログロブリン、レチノール結合タンパク質など関連するマーカーを挙げることができる。また、血液検査より悪性腫瘍の関連マーカーとして、癌胎児性抗原、フェリチン、免疫抑制酸性蛋白、CA15-3（乳癌）、 α -フェトプロテイン（肝癌）、CA19-9（膵癌）、などを挙げるることができる。

【0007】 自己免疫疾患に代表される全身エリテマトーデスで見られる抗核抗体あるいは慢性関節リウマチで見られる変性 IgG 抗体などの抗体検索にも対応する複数の抗原をそれぞれ関連マーカーとして挙げることができる。一方、感染症における起炎菌の特定として、例えば *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* などのグラム陽性菌や *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* などのグラム陰性菌、さらには真菌類の *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, 病原ウイルスなど特定の表層抗原を関連マーカーとして挙げることができる。このように、検出目的に適うあらゆる抗原もしくはあらゆる抗体を表わす。

【0008】

【発明が解決すべき課題】 従来、イムノクロマトグラフ法を用いた体外診断薬分野への応用として、現在市販さ

れている妊娠診断薬（クリアブルーワンステップ（登録商標）ユニバース社製）にみられるように、妊娠の重要なマーカーとして、尿中のヒトゴナドトロピン ペプチドホルモンの検出でもって妊娠の有無を判定もしくは診断の一助とする方法は体外診断薬の分野では操作が簡単、迅速、かつ、正確な情報が得られる点で画期的な製品である。

【0009】本発明者らは検出目的に適う複数のマーカーをイムノクロマトグラフ法を用い同時に検出することによって、例えば診断薬分野においては、今までの診断薬の概念を進展・拡大させることを目的としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】以下、本発明の完成に至った経緯および課題を解決するための手段について詳細に述べる。近年、抗原-抗体反応を利用して、目的とする免疫学的能力を有する物質の検出は医療分野をはじめ食品分野あるいは環境分野に応用されすばらしい進歩を遂げている。

【0011】そもそも、抗原-抗体反応そのものは生体内あるいは自然界で必然性に応じて反応が生じているものであり、その原理・仕組みを人類が解明しつつあることによって多大な恩恵を受けている。特に医療分野では診断の予測あるいは診断の一助として大きな意義をもっており、血液、尿、糞便、体液などを被検液として用いるため、患者への苦痛を与えることなく検査できる点が利点である。

【0012】本来、抗原-抗体反応とは「錠前と鍵穴」の関係にたとえられるごとく、免疫学的な反応に授かる物質と対応する物質との結合によって特異的な結合体を形成するものであって、その大部分は共有結合のような強い結合ではなく、極く弱い結合を保持し成立している。このことから人為的に抗原-抗体反応複合体より抗原あるいは抗体それぞれ単独に回収することができる。

【0013】したがって、抗原-抗体反応系には、丁度、酵素に対する基質の関係と同様にアフィニティー（親和性）の概念が成立する訳である。すなわち、目的とする酵素を単離・精製したいときは、目的とする酵素の基質をあらかじめ樹脂（担体）に固定しておき、目的とする酵素のみが基質と結合するので、水洗後溶離液で溶出することによって一挙に高純度の酵素が回収できる。このような単離・精製手段をアフィニティークロマトグラフィーと命名している。

【0014】本法の検出手段として用いるイムノクロマトグラフィーは、クロマトグラフィーの体系からみると、まさしくアフィニティークロマトグラフィーに包括されるべきものであって、一般にクロマトグラフィーの名称で述べられている溶質と溶媒との分配係数の差でもって物質を分離・精製するという手段とは異なるものである。

【0015】すなわち、あらかじめ支持体上に固相化し

た抗原もしくは抗体が存在し、支持体の下端に着色した標識微粒子が水などの溶媒を媒体として支持体の毛細管現象の作用で順次拡散・移動し、その際、免疫的に形成せしめた複合体-着色標識粒子によって、先の抗原もしくは抗体を固相化しておいた位置にその複合体-微粒子が到達し、その場所で特異的に抗原-抗体反応を生じ、着色シグナルとして目視的に観察することができるものである。以上のようなアフィニティークロマトグラフィーの原理に基づいて、本法をさらに発展せしめ鋭意研究を重ねた結果、以下、本発明の完成に至った。

【0016】本特許記載のイムノクロマトグラフィーに用いる微粒子には色調の異なる別々のコロイド状金属粒子、あるいは色調の異なる別々のコロイド状金属酸化物粒子、さらには色調の異なる別々のコロイド状非金属粒子を用いることができるが、色調の多様性やイムノクロマトグラフィー展開後の鮮明さを考慮すると合成高分子ラテックス粒子が好ましい。

【0017】イムノクロマトグラフィーに用いる市販の合成高分子ラテックス粒子は当業者が本クロマトグラフィーを最適な条件で実施できるように設計されており、また現在の高分子化学の合成技術水準からみても、高い水準の技術を駆使した高品質の製品である。

【0018】ちなみに、本発明者らの本特許記載の実施例における使用実績からみても、抗原もしくは抗体による標識粒子の調製、標識後の乾燥工程による安定性さらには支持体上での拡散・移動性および固相化位置における着色の鮮明性などに何ら問題を生じるものではない。このような高品質のラテックス粒子は当業者が容易に入手することができる。

【0019】例えばブルーラテックス粒子分散液およびレッドラテックス粒子分散液の色調の異なったラテックス粒子はポリマーラボラトリー社より容易に入手することができる。その他、ローヌプーラン社、セラダイン社、インターナショナルダイナミクスコーポレーション社および積水化学工業株式会社などからも入手が可能である。

【0020】また、イムノクロマトグラフ用のラテックス粒子の大きさは0.05~5 μ mの範囲で市販されており、この範囲内の任意の大きさで使用も可能であるが、好ましくは標識する抗原もしくは抗体によって、適宜粒子の大きさを選択することも感度・精度の上からも重要であり通常0.45 μ mの大きさが適している。

【0021】次に本発明に用いるイムノクロマトグラフィーに使用する支持体について説明する。本発明に有用なイムノクロマトグラフィーに使用する支持体は毛細管現象を起こす作用を有し、かつ、合成高分子標識ラテックス粒子と検出しようとする物質との複合体がイムノクロマトグラフ用展開剤、例えば水や緩衝液などですみやかに拡散・移動できるような支持体であれば良い。

【0022】一般にイムノクロマトグラフィーに使用す

る担体としてガラス繊維状のシート、濾紙、あるいはナイロンシート、ニトロセルロースシートなどが使用できるが、本発明に好適なシートとしてはニトロセルロースシートである。ニトロセルロースシートはBAS-85 (Schleicher&Schuell 社製)、HAHY (Millipore 社製) として市販されており、当業者は容易に入手することができる。

【0023】次に支持体上へ検出目的に適う複数の抗原もしくは抗体の固相化方法について説明する。本発明の完成に有用な支持体としてニトロセルロースシートを選
10 ぶことができ、本支持体へ検出目的に適う複数の抗原もしくは抗体を固相化するにあたっては、実施例に記載した態様を例にあげて具体的に説明すれば良く理解することができる。

【0024】すなわち、通常イムノクロマトグラフィーを行なうのに適した任意の大きさに整えたニトロセルロース支持体をあらかじめ準備し、本支持体の任意に選んだ一定のゾーンに第1の抗原もしくは抗体（実施例1では抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体）を塗布または
20 スプレーで散布し、上記以外のゾーンに第2の抗原もしくは抗体（実施例1では抗ヒトヘモグロビン抗体）を塗布またはスプレーで散布するなどして固相化する。また第3、第4、第5などの検出目的に適う抗原もしくは抗体の固相化も同様に為し得る。

【0025】なお、ここで支持体に固相化した抗原もしくは抗体は後のイムノクロマトグラフィーの展開によって、それぞれ位置の異なる固相化したゾーンで抗原-抗体反応を生じ着色する訳であるから、あらかじめ着色の形状を設定しておくことが望ましい。

【0026】しかしながら、本発明においてはそれぞれのゾーンで色調の異なる着色を示すので着色の形状が
30 ●、一、+、◎、×、△、…などのいかなる表示方法であっても許容できる。好ましくは、スポット状（●）またはストリーク状（一）の表示が簡単、明瞭である。

【0027】次に、乾燥工程について説明する。通常の乾燥は室温放置で良いが、必要があれば30～50℃の熱風による乾燥あるいは真空乾燥などの方法を適宜行っても差支えはない。乾燥後、ニトロセルロース支持体上の第1および第2あるいは第3、第4、第5などの検出
40 目的に適う抗原もしくは抗体の固相化したゾーン以外の領域を不活化するために、別なタンパク質でもってマスキングすることが通常行われている。

【0028】一般にマスキング剤としては生理食塩水に0.2%溶解したカゼイン溶液あるいは1%スキムミルク (DIFCO 社製)、4%ブロックエース（登録商標）
（明治乳業社製）などを用いるが、使用する抗原または抗体あるいは支持体の性質によって、その都度適切なマスキング剤を選択する必要がある。

【0029】次に、合成高分子標識ラテックス粒子の調製法ならびに装着方法について説明する。各々の色調を
50

有する別々のラテックス粒子にそれぞれ検出目的に適う複数の抗原もしくは抗体を標識するにあたっては、例えば、赤色のラテックス粒子には第1の抗原もしくは抗体、青色のラテックス粒子には第2の抗原もしくは抗体、さらに黄色、あるいは緑色のラテックス粒子には第3、第4の抗原もしくは抗体をそれぞれ個別に標識しておく。

【0030】標識方法は通常行われている方法であれば特に限定はしないが、一般にはラテックス粒子と標識する物質を室温約1時間位混和することによって達成できる。その後、各々標識した着色ラテックス粒子を個別に遠心分離などの方法またはミリポアフィルターによる吸引口過法によって集め、通常使用されている緩衝液例えばリン酸緩衝液などでよく洗浄後、マスキング剤で各々の標識ラテックス粒子を個別にマスキングしておく。マスキング剤は先きの支持体で抗原もしくは抗体の固相化後に用いたマスキング剤と同様なもので良い。

【0031】しかしながら、マスキング剤の選択は標識に使用した抗原または抗体および支持体の性質によって、その都度適格か否かを判断する必要がある。このようにして各々、個別に標識し得た着色ラテックス粒子を保存液に貯えておく。各々の標識着色ラテックス粒子を保存した液より一定量ずつ取り出しよく混和後、よく洗浄して不織布などの多孔性ポリマーに含浸させて凍結乾燥を行う。これを支持体の一定の場所に装着することによって本発明の検出装置が完成する。なお、標識ラテックス粒子の支持体への装着については特に限定するものではなく、標識ラテックス粒子を直接支持体へ塗布する方法等も利用することができる。

【0032】装着位置についてはイムノクロマトグラフィーの展開方法によって定まるもので、例えば展開が上昇法の場合には下端部に、下降法の場合には上端部に、水平方式の場合には両端部のどちらか一方に、円形方式の場合には同心円の中心部分に装着することになる。

【0033】本発明においては展開方法を特に限定するものではないが、通常、一般に行われている上昇法が望ましい。この場合、試験者は装着した支持体部分に後述する被検液浸漬用担体を重ね合せた部分を被検液に浸すのみで展開できるので有利である。

【0034】次に、検査具について説明する。（図1参照）

イムノクロマトグラフィーに関する検査具（反応装置）については、すでに数多くの発明が開示されているので特に、本発明で詳細に言及する必要はない。しかしながら、本発明の方法が確実にまた正確に当事者によって容易に実施できる「証」としてその1例を記す。

【0035】実施例に検査具として示した反応装置はニトロセルロースなど、使用しやすさなどを考慮して任意の長方形の大きさに裁断し支持体を作製する。支持体の下端部分を被検液に浸して毛細管現象により水などの溶媒を媒体として微量に溶けている抗原もしくは抗体を吸

い上げ、ニトロセルロース支持体上部へ移動せしめる不活性材質（被検液浸漬用担体をいう）から選ばれる部分を装着する。本不活性な材質には一般に濾紙、ガラス繊維シート、メンブランフィルターシートなどが用いられる。

【0036】ニトロセルロース支持体の下端部分には先に説明した不織布上に載せた標識混合着色ラテックス粒子の凍乾物（着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体）を一定の大きさに裁断したものを例えば、両面テープなどで軽く固定しておくか、最終的に検査具として組み終えた段階でセロテープなどで圧着固定しても差支えがない。また、図1に示したごとく、ニトロセルロース上のそれぞれ異なった位置にあらかじめ検出目的に適う複数の抗原もしくは抗体を固相化しておく。

【0037】一方、ニトロセルロース支持体の上端部分には、図1に示すごとく吸水性の担体を装着することによって、イムノクロマトグラフィーの展開が正確に、また迅速に為し得るため、さらには展開し終えた後の液漏れなどを防ぐ目的で本担体を装着しておくことが望ましい。

【0038】このような吸水性担体はアドバンテック東洋社製の濾紙No. 526やワットマン社製の17Cr, 3MMなどが市販されており容易に入手することができる。以上、このような簡単な検査具で本発明の方法を検証または実施することができる。

【0039】本明細書において記載の都合上、検出すべき物質が抗原である場合には例えば、ニトロセルロース支持体上に検出すべき物質の一定部位を認識できる抗体を固相化し、一方、合成高分子ラテックス粒子への標識には先きの抗体とは別な個所の抗原分子を認識できる抗体であれば本発明の方法は達成できる。

【0040】また、本発明は上述とは逆に抗体の検出の場合には、固相化抗原-検出すべき抗体-検出すべき物質の抗体からなる系でもって実施できることは当業者には容易に理解されよう。したがって、本発明は検出すべき物質が抗原である場合だけに限定されず、抗体をも包含するものであり、表現としては「抗原もしくは抗体」として記してあるが、どちらか一方が定まればおのずから対応する他方が定まることになり、「抗原」および「抗体」なる文字を適宜使い分けることにより、本発明の方法を実施することができる。

【0041】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明をより詳細に、具体的に説明するが、本発明の方法はこの実施例によって何ら限定されるものではない。

【0042】実施例1 尿中のヘモグロビン、アルブミンの同時検出、測定

（1）抗体固相化支持体の作製

ニトロセルロースシート（BAS-85, Schleicher & Schuell 社製）を5mm×30mmに裁断し、その下端

より10mmの位置に抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体溶液0.5mg/ml（日本バイオテスト社製）、20mmの位置に抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体溶液0.5mg/ml（日本バイオテスト社製）を各々エアブラシ（オリンパス社製）を用いて塗布し、抗ヒトヘモグロビン抗体および抗ヒトアルブミン抗体のラインを作製した。室温で2時間乾燥後、1%スキムミルク（DIFCO 社製）-0.1%ツィーン20を含むPBS（リン酸生理食塩液）に37℃、2時間浸漬し充分マスキングを行った。その後、充分に乾燥し抗体固相化支持体を作製した。

【0043】（2）着色ラテックス粒子標識抗体の調製

a. ブルーラテックス粒子標識抗ヒトヘモグロビン抗体
ブルーラテックス粒子分散液（PL-Latex, 10%, 450nm, Polymer Laboratories社製）300μlにPBS 1.2mlを加え、13,000rpm, 5分間遠心分離を行った。沈査に抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体溶液（0.5mg/ml）（日本バイオテスト社製）1mlを加え、充分混和して、室温1時間反応を行った。未反応の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を除去するため、13,000rpm, 5分間遠心分離を行い、沈査をPBS 1.5mlで懸濁させ再度遠心分離を行った。4%ブロッケーヌ（明治乳業社製）1mlを加え、室温60分間反応させてマスキングを行った。その後、13,000rpm, 5分間遠心分離を行い、沈査を1%スキムミルク-0.01%アジ化ナトリウムを含むPBS 1.5mlに懸濁させ冷蔵保存した。

b. レッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体
レッドラテックス粒子分散液（PL-Latex, 10%, 450nm, Polymer Laboratories社製）および抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（0.05mg/ml）（日本バイオテスト社製）を用いて上記と同様な操作で調製した。

c. 着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体

各々の着色ラテックス粒子標識抗体を等量混和し、ベンリーゼ（登録商標）不織布（旭化成社製）5mm×5mmに10μl含浸させ凍結乾燥して調製した。

【0044】（3）検査具の作製

抗体固相化支持体の下端から2.5mmの位置まで着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体を重ねた。さらに、着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体上に被検液浸漬用担体の下端から2.5mmの位置まで重ねた。また、抗体固相化支持体の上端から5mmの位置まで吸水性担体5mm×20mm（No. 526, アドバンテック東洋社製）を重ねた。最後に透明なテープを上部に貼り固定して検査具とした。（図1）

【0045】（4）標準液を用いた反応性試験

ヒトアルブミン（結晶, 生化学工業社製）、ヒトヘモグロビン（2回結晶, Sigma 社製）を30μg/ml,

0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように各々 PBS で溶解し 2 種の標準液を調製した。標準液 200 μl を検査具の被検液浸漬用担体に滴加してのち展開した。5 分後、あらかじめ固相化したライン部分の着色の有無により判定を行った。図 2 に示すように 2 種の標準液を展開した場合には赤色のライン (ヒトアルブミン) と青色のライン (ヒトヘモグロビン) の両者が検出された。また、ヒトアルブミン標準液では赤色のラインのみ、ヒトヘモグロビン標準液では青色のラインのみが検出され、対照 (PBS) では着色ラインは見られず非特異発色はなかった。

【0046】(5) 尿検体を用いた反応性試験

糖尿病と診断された患者の尿 10 例を用いて反応性試験

表 1

検体 No.	本 法		微量アルブミン (アルブミン)	尿潜血 (ハモコンビステックス®)
	ヒトアルブミン	ヒトヘモグロビン		
1	+	+	+	+
2	+	-	+	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	±
5	+	-	+	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	+	-	+	-
9	+	-	+	-
10	-	-	-	-

【0048】実施例 2 尿中 β_2 -ミクログロブリン、アルブミン、ヒトレチノール結合タンパクの同時検出、測定

(1) 抗体固相化支持体の作製

ニトロセルロースシート (BAS-85) を 5mm×50mm に裁断し、その下端より 10mm の位置に抗ヒト β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (コスモ・バイオ社製)、20mm の位置に抗ヒトレチノール結合タンパクモノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (ケミコン社製)、40mm の位置に抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (日本バイオテスト社製) をそれぞれ細字用毛筆で塗布し、抗ヒト β_2 -ミクログロブリン抗体、抗ヒトアルブミン抗体および抗ヒトレチノール結合タンパク抗体のラインを作製した。室温で 2 時間乾燥後、1% スキムミルク (DIFCO 社製) - 0.1% ツィーン 20 を含む PBS に 37℃、2 時間浸漬しマスキングを行った。その後、十分に乾燥し抗体固相化支持体を作製した。

を行なった。なお、対照として尿潜血は『ハモコンビステックス (登録商標)』(マイルス三共社製)、ヒトアルブミンの検出は尿中微量アルブミン検出試薬『アルブシュア (登録商標)』(森永乳業社製) を用いて測定し、両法の比較を行った。その結果、本法においては 10 例中ヒトアルブミン陽性-ヒトヘモグロビン陽性が 2 例、ヒトアルブミン陽性-ヒトヘモグロビン陰性が 4 例、ヒトアルブミン陰性-ヒトヘモグロビン陰性が 4 例であった。検体 No. 4 の尿潜血反応の結果を除き本法と別法は完全に一致した。

【0047】

【表 1】

【0049】(2) 着色ラテックス粒子標識抗体の調製
a. ブルーラテックス粒子抗ヒト β_2 -ミクログロブリン抗体

ブルーラテックス粒子分散液 (PL-Latex, 10%, 450nm, Polymer Laboratories 社製) 100 μl に PBS 1.2 ml を加え、13,000rpm, 5 分間遠心分離を行った。沈査に抗ヒト β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体溶液 (0.5 mg/ml) (ケミコン社製) 0.3 ml を加え、充分混和して室温 1 時間反応した。未反応の抗ヒト β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体を除去するため、13,000rpm, 5 分間遠心分離を行い、沈査を PBS 1.5 ml に懸濁させ再度遠心分離を行った。沈査に 4% ブロックエース 1 ml を加え、室温 60 分間反応させてマスキングを行った。その後、13,000rpm, 5 分間遠心分離を行い、沈査を 1% スキムミルク - 0.01% アジ化ナトリウムを含む PBS 0.5 ml に懸濁させ冷蔵保存した。

b. レッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミン抗体
先に実施例 1 で調製したレッドラテックス粒子標識抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を使用。

c. グリーンラテックス粒子標識抗レチノール結合タンパク抗体

グリーンラテックス粒子分散液 (PL-Latex, 10%, 450 nm, Polymer Laboratories 社製) および抗ヒトレチノール結合タンパクモノクローナル抗体 (0.5 mg/ml) (ケミコン社製) を用いて上記と同様な操作で調製した。

d. 着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体

各々の着色ラテックス粒子標識抗体を等量混和し、ベンリーゼ (登録商標) 不織布 (旭化成社製) 5 mm × 5 mm に 10 μl 含浸させ凍結乾燥して調製した。

【0050】(3) 検査具の作製

実施例 1 と同様な方法で作製した。

【0051】(4) 標準液を用いた反応性試験

β₂-ミクログロブリン (日本バイオテスト社製)、ヒトアルブミン (結晶、生化学工業社製)、レチノール結合タンパク (バインディングサイト社製) を各々 0.3 μg/ml, 30 μg/ml, 0.3 μg/ml になるように PBS で溶解し、標準液を調製した。3 種混合標準液を展開した場合には青色のライン (ヒト β₂-ミクログロブリン)、赤色のライン (ヒトアルブミン)、緑色のライン (ヒトレチノール結合タンパク) が検出された。また、ヒト β₂-ミクログロブリンとヒトアルブミンの標準液では青色および赤色の 2 本のライン、ヒトアルブミンとヒトレチノール結合タンパクでは赤色と緑色のライン、ヒト β₂-ミクログロブリンとヒトレチノール結合タンパクでは青色と緑色のラインが検出された。なお PBS だけを展開したものでは着色ラインは見られず非特異発色はなかった。

表 2

検体 No.		β ₂ - ミクログロブリン	本法 レチノール 結合タンパク	アルブミン	MESACUP [®] β ₂ - MICRO [®]	LC パルチゲン [®] RBP [®]	アムニシア [®]
健常者	1	-	-	-	20 (-)	60 (-)	-
	2	-	-	-	35 (-)	50 (-)	-
糖尿病患者	1	+	+	+	889 (+)	870 (+)	+
	2	-	-	-	64 (-)	50 (-)	-
	3	-	-	-	49 (-)	50 (-)	-
	4	+	+	+	3500 (+)	1200 (+)	+
	5	+	-	+	1093 (+)	150 (-)	+

* 1 : ng/ml, カットオフ値を 500ng/ml に設定

* 2 : ng/ml, カットオフ値を 300ng/ml に設定

【0054】実施例 3 血清中ミオグロビン、ミオシン L 鎖、クレアチンキナーゼ-MB の同時検出、測定

(1) 抗体固相化支持体の作製

ニトロセルロースシート (BAS-85) を 5 mm × 30 mm に裁断し、その下端より、10 mm の位置に抗ヒトミオシン L 鎖モノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (ROUGER BIO・TECH 社製) 15 mm の位置に抗ヒトクレアチンキナーゼ-MB モノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (ケミコン社製)、20 mm の位置に抗ヒト

色のライン (ヒトレチノール結合タンパク) が検出された。また、ヒト β₂-ミクログロブリンとヒトアルブミンの標準液では青色および赤色の 2 本のライン、ヒトアルブミンとヒトレチノール結合タンパクでは赤色と緑色のライン、ヒト β₂-ミクログロブリンとヒトレチノール結合タンパクでは青色と緑色のラインが検出された。なお PBS だけを展開したものでは着色ラインは見られず非特異発色はなかった。

【0052】(5) 尿検体を用いた反応性試験

10 健常者尿 2 例、糖尿病と診断された患者の尿 5 例を用いて反応性試験を行った。なお、対照として β₂-ミクログロブリンは MESACUP β₂-MICRO テスト (登録商標) (MBL 社製)、ヒトアルブミンはアルブシューア (登録商標) (森永乳業社製)、ヒトレチノール結合タンパクは LC パルチゲン RBP (登録商標) (ヘキスト社製) を用いて測定した。表 2 に結果を示したが健常者 2 例については本法 3 項目および別法ともすべて陰性であった。糖尿病患者においては本法 3 項目について全項目陽性 2 例、全項目陰性 2 例、β₂-ミクログロブリン陽性-アルブミン陽性-レチノール結合タンパク陰性が 1 例であった。また別法と比較したところ 3 項目ともすべて一致した。

【0053】

【表 2】

ミオグロビンモノクローナル抗体溶液 0.5 mg/ml (日本バイオテスト社製) を細字用毛筆で塗布し、抗ヒトミオシン L 鎖抗体、抗ヒトクレアチンキナーゼ-MB 抗体および抗ヒトミオグロビン抗体のラインを作製した。室温で 2 時間乾燥後、1% BSA-0.1% ツィーン 20 を含む PBS に 37℃、2 時間浸漬し、マスキングを行った。その後、充分に乾燥し抗体固相化支持体を作製した。

【0055】(2) 着色ラテックス粒子標識抗体の調製

a. ブルーラテックス粒子標識抗ヒトミオシンL鎖抗体
ブルーラテックス粒子分散液 (PL-Latex, 10%, 450 nm, Polymer Laboratories社製) 100 μ l に PBS 1.2 ml を加え、13,000 rpm, 5 分間遠心分離を行った。沈査に抗ヒトミオシンL鎖抗体溶液 (0.5 mg/ml) (ROUGER BIO・TECH社製) 0.3 ml を加え、充分混和後、室温 1 時間反応を行った。未反応の抗ヒトミオシンL鎖抗体を除去するため、13,000 rpm, 5 分間遠心分離を行い、沈査を PBS 1.5 ml に懸濁させ再度遠心分離を行った。沈査に 4 % ブロックエース 1 ml を加え、室温 60 分間反応させてマスキングを行った。その後、13,000 rpm, 5 分間遠心分離を行い、沈査を 1 % BSA-0.01 % アジ化ナトリウムを含む PBS 0.5 ml に懸濁させ冷蔵保存した。

b. レッドラテックス粒子標識抗ヒトクレアチンキナーゼMB抗体

レッドラテックス粒子分散液および抗ヒトクレアチンキナーゼMBモノクロナール抗体 (0.5 mg/ml) (ROUGER BIO・TECH社製) を用いて a. と同様な操作を行って調製した。

c. グリーンラテックス粒子標識抗ヒトミオグロビン抗体

グリーンラテックス粒子分散液および抗ヒトミオグロビンモノクロナール抗体 (0.5 mg/ml) (日本バイオテスト社製) を用いて a. と同様な操作を行って調製した。

d. 3 種着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体

各々の着色ラテックス粒子標識抗体を等量混和し、ベンリーゼ (登録商標) 不織布 5 mm \times 5 mm に 10 μ l 含

浸させ凍結乾燥して調製した。

【0056】 (3) 検査具の作製

実施例 1 と同様な方法で作製した。

【0057】 (4) 標準液を用いた反応性試験

ヒトミオシンL鎖 (オーイーエムコンセプト社製)、ヒトクレアチンキナーゼMB (ターナー社製)、ヒトミオグロビン (DAKO社製) を各々 10 ng/ml, 10 ng/ml, 80 ng/ml になるように 0.1 % BSA を含む PBS で溶解し、標準液を調製した。3 種混合標準液を展開した場合には青色のうっすらとしたライン (ヒトミオシンL鎖)、赤色のうっすらとしたライン (クレアチンキナーゼMB)、緑色の比較的濃いライン (ヒトミオグロビン) として検出された。また、ヒトミオシンL鎖とヒトクレアチンキナーゼMBの標準液では青色および赤色のうっすらとした 2 本のライン、ヒトクレアチンキナーゼMBとヒトミオグロビンでは淡赤色と緑色のライン、ヒトミオグロビンとヒトミオシンL鎖では淡青色と緑色のラインが検出された。なお、0.1 % BSA を含む PBS のみを展開した系ではラインは検出されず非特異発色もみられなかった。

【0058】 (5) 血清を用いた反応性試験

健常者血清 2 例、急性心筋梗塞と診断された患者の血清 3 例を用いて反応性試験を行った。健常者の血清 2 例はミオシンL鎖、クレアチンキナーゼMB、ミオグロビンともに陰性であった。また急性心筋梗塞の患者の血清では全項目陽性が 1 例、ミオシンL鎖陰性-クレアチンキナーゼMB陽性-ミオグロビン陽性が 2 例であった。(表 3)

【0059】

【表 3】

表 3

検体 No		本 法		
		ミオシンL鎖	クレアチンキナーゼMB	ミオグロビン
健常者	1	-	-	-
	2	-	-	-
患者血清	1	-	+	+
	2	+	+	+
	3	-	+	+

【0060】実施例 4 糞便中のヘモグロビン、トランスフェリンの同時検出、測定

(1) 抗体固相化支持体の作製

ニトロセルロースシート (BAS-85) を 5 mm \times 30 mm に裁断し、その下端より、10 mm の位置に抗ヒトトランスフェリンモノクロナール抗体溶液 0.5 mg/ml (ケミコン社製)、20 mm の位置に抗ヒトヘモグロビンモノクロナール抗体溶液 0.5 mg/ml (日

本バイオテスト社製) を各々細字用毛筆を用い塗布し、抗ヒトトランスフェリン抗体および抗ヒトヘモグロビン抗体のラインを作製した。室温で 2 時間乾燥後、1 % スキムミルク (DIFCO 社製) - 0.1 % ツィーン 20 を含む PBS に 37 $^{\circ}$ C、2 時間浸漬しマスキングを行った。その後、十分に乾燥し抗体固相化支持体とした。

【0061】 (2) 着色ラテックス粒子標識抗体の調製

a. レッドラテックス粒子標識抗ヒトトランスフェリン

抗体

レッドラテックス粒子分散液 (PL-Latex, 10%, 450 nm, Polymer Laboratories社製) 100 μ l に PBS 1.2 ml を加え、13,000 rpm, 5 分間遠心分離を行った。沈査に抗ヒトトランスフェリンモノクロナール抗体溶液 (0.5 mg/ml) (アドバンスイムノケミカル社製) 1 ml を加え、混和後、室温 1 時間反応を行った。未反応の抗ヒトトランスフェリンモノクロナール抗体を除去するために、13,000 rpm, 5 分間遠心分離し、沈査を PBS 1.5 ml に懸濁させ再度遠心分離を行った。沈査に 4% ブロックエース 1 ml を加え、室温 60 分間反応させてマスキングを行った。反応後、13,000 rpm, 5 分間遠心分離し、沈査を 1% BSA-0.01% アジ化ナトリウムを含む PBS 0.5 ml に懸濁させ冷蔵保存した。

b. ブルーラテックス粒子標識抗ヒトヘモグロビン抗体 実施例 1 で調製したものを使用した。

c. 着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体

各々の着色ラテックス粒子標識抗体を等量混和し、ベンリーゼ (登録商標) 不織布 5 mm \times 5 mm に 10 μ l 含浸させ凍結乾燥して調製した。

【0062】(3) 検査具の作製

実施例 1 と同様な方法で作製した。

【0063】(4) 標準液を用いた反応性試験

ヒトトランスフェリン (ケミコン社製)、ヒトヘモグロビン (2 回結晶、Sigma 社製) を各々 100 μ g/ml になるように 0.1% BSA を含む PBS で溶解し、2 種の標準液を調製した。標準液 200 μ l を検査具の被検液浸漬用担体に滴加してのち展開した。5 分後、ラインの着色の有無により判定を行った。2 種の標準液を展

表 4

検体 No.	保存期間	本 法			OC-ヘモディア [®]
		ヒトトランスフェリン	ヒトヘモグロビン		
大腸がん患者	0	+	+	+	
	1	+	±	±	
	3	+	-	-	
	7	±	-	-	
健常者	0	-	-	-	
	1	-	-	-	
	3	-	-	-	
	7	-	-	-	

【0066】

【発明の効果】本発明の方法によれば、免疫学的に異なる検出目的に適う物質を検出するに当たり、色調の異なる

開した場合には赤色のライン (ヒトトランスフェリン) と青色のライン (ヒトヘモグロビン) が検出された。またヒトトランスフェリン標準液では赤色のラインのみ、ヒトヘモグロビン標準液では青色ののみが検出され、対照 (0.1% BSA を含む PBS) ではラインは見られず非特異発色はなかった。

【0064】(5) 患者便を用いた反応性試験

便中のヘモグロビン、トランスフェリンの安定性を調べる目的で大腸ガンと診断された患者の便を室温に放置し、1 日目、3 日目、7 日目にそれぞれサンプリングを行った。糞便 10 mg を採取して 0.005% ツィーン 20-0.1% BSA を含む PBS 2 ml に懸濁させよく混和後、3,000 rpm, 10 分間遠心分離を行い、便懸濁液とした。便懸濁液 200 μ l を被検液浸漬用担体に滴加してのち展開した。なお、健常者の便についても同様の測定を行った。また、別法として便中のヘモグロビン測定試薬『OC-ヘモディア (登録商標)』(栄研化学社製) を用いた。本法において大腸がん患者の便については保存開始時ではヒトヘモグロビン、ヒトトランスフェリンともに陽性を示したが、ヒトヘモグロビンについては 1 日目で疑陽性になり、3 日目から 7 日目には陰性になった。一方、ヒトトランスフェリンについては 3 日目まで陽性を示したが、7 日目では疑陽性になった。また、別法の OC-ヘモディア (登録商標) ではヘモグロビンの検出について 1 日目で疑陽性となり、3 日目以降は陰性であった。さらに、健常者便では本法および OC-ヘモディア (登録商標) とも陰性であり非特異反応は起こらなかった。

【0065】**【表 4】**

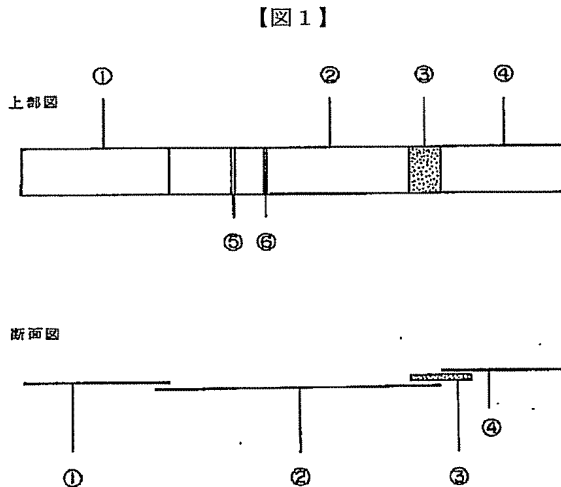
る標識ラテックス粒子を用いたイムノクロマトグラフィーによって、複数の物質を目視的に同時に検出することができる。この方法によって、例えば特定の疾患に対す

る関連のマーカーを同時に検出することができるので、臨床家にとってより迅速で、より信頼性の高い診断を下すことも可能であり、また、複数の疾患に対する関連マーカーを用いれば、未知の疾患に対する総合所見からの診断の有力な証拠になりうる。一方、産業界における有害物質や発癌物質の検出、食品中の有害汚染物質もしくは、有害微生物の検出にも応用することができる。このように本特許のもつ意義はすべての産業界において抗原-抗体反応を基本とするすべての物質の検出が可能であり、複数の関連マーカーを同時に使用することによって、より確かな証拠が得られ、従来法に較べて新規性と進歩性が飛躍的に期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の検査具の 1 態様を示したものであり、該検査具上部図および断面図である。

【符号の説明】



フロントページの続き

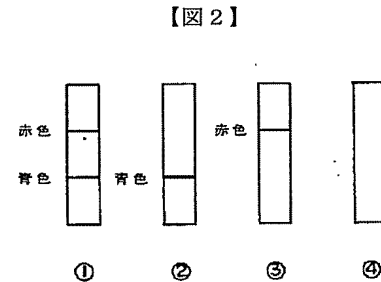
(72)発明者 若杉 昌彦
東京都中央区日本橋室町 1-5-3 わか
もと製薬株式会社内

- 1 吸水性担体
- 2 抗体固相化支持体
- 3 着色ラテックス粒子標識抗体凍乾担体
- 4 被検液浸漬用担体
- 5 第 2 抗体固相化ゾーン
- 6 第 1 抗体固相化ゾーン

【図 2】本発明の方法を用いた測定結果の 1 態様を示したものであり、尿中のヒトヘモグロビンおよびヒトアルブミンを同時に検出、測定した結果である。

【符号の説明】

- 1 ヒトアルブミン標準液とヒトヘモグロビン標準液の混合液を展開したクロマトグラム
- 2 ヒトアルブミン標準液を展開したクロマトグラム
- 3 ヒトヘモグロビン標準液を展開したクロマトグラム
- 4 対照 (PBS) を展開したクロマトグラム



(72)発明者 前田 孚
東京都中央区日本橋室町 1-5-3 わか
もと製薬株式会社内